

# **BOLINDUCTIE EN BOLGROEI BIJ WEEFSELKWEEK VAN LELIE**

---

PT project 13893

**Dr. Geert-Jan de Klerk**, Plant Breeding Wageningen UR

Rhenen/Wageningen, december 2013

## Inhoud

<b>Algemene Samenvatting .....</b>	<b>4</b>
<b>H1. Algemene Inleiding .....</b>	<b>5</b>
<b>H2. Materialen en methoden .....</b>	<b>7</b>
Standaard weefselkweek condities.....	7
Minimale concentratie van NaClO voor ontsmetting van vloeistoffen .....	7
Schatting van kruisbesmetting.....	7
Schatting van hydrostatische verwante verontreiniging .....	8
Bepaling van de transpiratie van schubben.....	9
Statistiek.....	9
<b>H3. Twee nog niet eerder gerapporteerde bronnen van besmetting .....</b>	<b>10</b>
Samenvatting .....	10
Inleiding.....	10
Resultaten .....	12
Bepaling van de effectieve concentratie van NaClO.....	12
Schubben spoelen met 0,03% NaClO in plaats van water .....	12
Effect van het afbreken van schubben ondergedompeld in 0,03% NaClO i.p.v. water of lucht....	14
Correlatie tussen de besmetting van explantaten die uit één schub zijn gesneden .....	17
Discussie.....	18
<b>H4. Het effect van het schubexplantaat op de groei van bolletjes.....</b>	<b>19</b>
Inleiding.....	19
Resultaten: .....	20
De grootte van explantaat .....	20
Het effect van het gebied op de schub waaruit het explantaat gesneden is. ....	22
Discussie.....	23
<b>H5. De rol van fotosynthese bij de bolgroei .....</b>	<b>24</b>
Inleiding.....	24
Resultaten .....	25
Discussie.....	27

<b>H6. De invloed van milde stress op bolgroei .....</b>	<b>28</b>
Inleiding.....	28
Resultaten en Discussie.....	29
<b>Referenties .....</b>	<b>31</b>
<b>Afgeleverde producten .....</b>	<b>32</b>

## **ALGEMENE SAMENVATTING**

**H1.** Lelie is een van de twee bolgewassen die op grote schaal in weefselkweek worden vermeerderd. De technieken zijn grotendeels hetzelfde als gebruikt door Robb bij haar proefschrift over weefselkweek van lelie in 1954. Het belangrijkste verschil is dat de technieken die Robb toepaste bij veldbollen sinds ong. 1980 ook bij weefselkweekbolletjes worden toegepast. Het doel van het huidige onderzoek is weefselkweek van lelie te verbeteren, vooral wat betreft bolgroei. De resultaten kunnen bij andere bolgewassen toegepast worden.

**H3.** Bij inzetten volgens de standaard procedure bleken er twee zwakke punten te zijn die veel extra besmetting veroorzaakten. In onze situatie was 30 - 50% van de besmetting het gevolg van deze zwakke punten. De zwakke punten konden heel makkelijk gerepareerd worden. Dezelfde zwakke punten spelen in meerdere of mindere mate bij vrijwel alle andere gewassen en kunnen daar op dezelfde manier gerepareerd worden.

**H4.** De groei van bolletjes hing af van de plaats op de schub waarvan het explantaat afkomstig was. Het apicale deel van de schub deed het veel minder dan het basale deel.

**H5.** Fotosynthese droeg significant bij aan de groei van bolletjes.

**H6.** Door een milde stress behandeling (bijv. 2 uur bij 38 °C) werd de groei van bolletjes gestimuleerd. Naast deze respons die op de lange termijn (maanden) de negatieve effecten van stress tegen gaat is er ook een respons voor de korte termijn (uren), waarschijnlijk de synthese van beschermende stoffen.

## H1. ALGEMENE INLEIDING

Weefselkweek van lelie begon in de vroege jaren vijftig van de vorige eeuw met het onderzoek van Sheila Robb, een PhD student aan de Massey University in Nieuw-Zeeland (Robb 1954; Robb 1957). Weefselkweek van monocotyle planten was op dat moment nog nauwelijks gedaan en haar voornaamste doel was een weefselkweekstelsel voor een monocotyl op te zetten (Robb 1954). Het gebruik van weefselkweek om vegetatief te vermeerderen was nog ver weg en het idee is tijdens haar promotieonderzoek in het geheel niet bij Robb opgekomen. Spoedig nadien werd de mogelijkheid echter onderkend. In eerste instantie werd de vermeerdering in slechts één stap gedaan zonder subcultuur: schubben van veld-bollen werden in vitro onder zulke omstandigheden gekweekt dat zij zo veel mogelijk bolletjes regeneerden. Dus eigenlijk hebben de onderzoekers conventioneel schubben naar het in vitro milieu overgezet. Ze gebruikten daarbij nieuwe door weefselkweek aangeboden mogelijkheden zoals toediening van suiker en plantenhormonen via het medium. Als voorbeeld: in 1978 rapporteerden Stimart and Ascher dat een bol met 100 schubben in 6 weken 8000 of meer bolletjes kon genereren.

In dezelfde tijd werd veel vooruitgang geboekt met virus verwijderen door meristeem cultuur. Vermeerdering in vitro i.p.v. veld-vermeerdering was de voor de hand liggende mogelijkheid om te voorkomen dat herinfectie optrad bij de opbouw van een commerciële partij. Aangezien er bij 'meristemen' slechts enkele kleine virus-vrije planten beschikbaar kwamen voor vermeerdering, voldeed de één-staps methode (besproken in de voorgaande alinea) niet en werd deze vervangen door een meerstaps procedure waarbij werd doorvermeerderd via de schubjes van in vitro geproduceerde bolletjes. Deze methode uit de vroege jaren 80 van de vorige eeuw wordt nog steeds op grote schaal toegepast.

Weefselkweek van lelie verloopt voorspoedig en heeft een geschatte productie van 50-100 miljoen bulblets per jaar heeft bereikt. Naast de productie van virusvrij/virus-arm uitgangsmateriaal is weefselkweekvermeerdering ook een grote hulp bij de veredeling. Door de snelheid van de weefselkweekvermeerdering kunnen nieuwe cultivars in 7-8 jaren op de markt

gezet worden (Langens 2003). Ondanks deze successen zijn er enkele grote problemen en zijn er ook gemiste kansen.

- (1) *Prijs*. Weefselkweekbolletjes zijn duur. Men was 20 jaar geleden algemeen van mening dat vermeerdering via somatische embryogenese in suspensieculturen de oplossing voor de hoge kostprijs van weefselkweekplantjes is, maar deze technologie kan nog steeds niet routinematig worden gebruikt bij lelie (in feite bij vrijwel geen enkel gewas). Andere weefselkweekmethodes waarbij eveneens vloeibaar medium wordt gebruikt zijn een adequate tijdelijke tussenoplossing. Er is bij vloeibaar medium een groot probleem, namelijk de endogene besmetting van het materiaal met micro-organismen. Dit is een veel groter probleem in vloeibaar medium dan bij weefselkweek op vast medium.
- (2) *Besmetting*. Het materiaal is moeilijk schoon te krijgen: besmetting blijft vaak latent aanwezig en komt er pas na maanden of zelfs jaren uit. Opgemerkt moet worden dat besmetting een probleem is bij alle startweefsels die ondergronds groenen.
- (3) *Recalcitrantie bij regeneratie*. Bij sommige genotypes maken schub-fragmenten te weinig of helemaal geen nieuwe bolletjes.
- (4) *Groei*. Een probleem in lelie weefselkweek is de relatief trage groei waardoor cycli lang duren. De bolletjes groeien in vitro een stuk trager dan in de grond.

In het hier beschreven onderzoek gaat het om het laatste probleem, de groei van bolletjes. Omdat weefsel met een latente besmetting minder goed groeit is ook intensief naar besmetting gekeken. Het onderzoek is het promotieonderzoek van Naser Askari MSc. De promovendus krijgt zijn salaris uit andere bronnen en het PT ondersteunt de begeleiding door Geert-Jan de Klerk van WUR Plantbreeding. Het onderzoek loopt nog maar vanwege externe redenen is dit verslag voor afronding van het promotieonderzoek geschreven.

## **H2. MATERIALEN EN METHODEN**

### ***Standaard weefselkweek condities***

Lelie bollen cv. Santander of Stargazer (omtrek 18-20 cm) werden na koude behandeling opgeslagen bij -1,0 °C. De weefselkweekprocedure was volgens Aguetaz et al. (1990). Schubben werden oppervlak-gesteriliseerd gedurende 30 min in 1% (w/v) NaClO, gespoeld voor 1, 3 en 10 min met steriel water en tot gebruik (gemiddeld 1-2 h) bewaard in een beker met steriel water. Twee explantaten van 7 x 7 mm werden met de abaxiale zijde geplaatst op 15 ml medium in kleine plastic bakjes (3,5 cm diameter). Het medium was Murashige en Skoog macro- en microelementen, 30 g l<sup>-1</sup> suiker, 0.4 mg l<sup>-1</sup> thiamine, 100 mg l<sup>-1</sup> myo-inositol, 7 g l<sup>-1</sup> agar (Microagar) en 0,05 mg l<sup>-1</sup> NAA ( $\alpha$ -naphthaleneazijnzuur). De explantaten werden gekweekt bij 25 °C en 30  $\mu$ E.m<sup>2</sup>.sec<sup>-1</sup> (Philips TL 33) voor 16 h per dag. Besmetting werd gescoord met tijdsintervallen van 2-4 dagen gedurende 6 weken. Na (meestal) 11 weken werden de andere parameters (regeneratie percentage, aantal bolletjes per explantaat en vers gewicht per bolletje) gescoord.

### **Hoofdstuk 3**

#### ***Minimale concentratie van NaClO voor ontsmetting van vloeistoffen***

Om de minimale effectieve concentratie van NaClO te bepalen, werden toenemende hoeveelheden van NaClO toegevoegd aan zwaar verontreinigd spoelwater om toenemende concentraties te verkrijgen (0, 0,01, 0,03, 0,06, 0, 1 en 1,5%, w/v). Na 24 uur bij kamertemperatuur werd 2 ml LB vloeibaar medium (Duchefa, Nederland) toegevoegd aan 2,0 ml van elke NaClO concentratie en werd het mengsel geïncubeerd bij 37 °C gedurende 3 d. Daarna werd bacteriële groei visueel geëvalueerd.

#### ***Schatting van kruisbesmetting***

Zestig buitenste en 30 binnenste schubben werden gesteriliseerd gedurende 30 minuten in een bekerglas met 1% NaClO oplossing plus een paar druppels

tween-20. De schubben werden vervolgens verdeeld over twee groepen (30 buitenste schubben en 15 binnenste schubben), verdeeld over twee bekertjes (dus per bekertje 45 schubben), drie keer gespoeld (1, 3 en 10 min), de eerste groep met steriel water en de tweede groep met 0,03% NaClO, en vervolgens opgeslagen tot gebruik (1-2h) in water of 0,03% NaClO, respectievelijk. De spoelvloeistof werd opgeslagen bij 4 °C. Explantaten werden gesneden en gekweekt zoals hierboven aangegeven. De besmetting van de schubben werd gedurende 6 weken cultuur gescoord. Het percentage besmetting als gevolg van kruisbesmetting werd berekend met de volgende formule:

$$\text{kruisbesmettings\%} = \frac{\text{besmettings\% water} - \text{besmettings\% NaClO}}{100 - \text{besmettings\% NaClO}} * 100.$$

### ***Schatting van hydrostatische verwante verontreiniging***

Schubben werden van de moederbol afgebroken onder stromend water of met stromend 0,03% NaClO en opgeslagen in water en 0,03% NaClO, respectievelijk. Ze werden oppervlak-gesteriliseerd op de gebruikelijke manier, en driemaal gespoeld met 0,03% NaClO. Explantaten werden gesneden en gekweekt zoals hierboven aangegeven. Besmetting werd gescoord gedurende 6 weken en de hydrostatische gerelateerde besmetting die plaats vindt wanneer schubben werden afgebroken van de moederbol werden berekend volgens de volgende formule:

$$\text{hydrostatische druk gerelateerd besmettings\%} = \frac{\text{besmettings\% water} - \text{besmettings\% NaClO}}{100 - \text{besmettings\% NaClO}} * 100$$

### ***Bepaling van verontreiniging in de spoelvloeistoffen***

De spoelvloeistoffen (water en NaClO-oplossingen) werden geënt op LB vast en 30 ml LB vloeibaar medium (Duchefa, Nederland). Op vast medium werd 25 µl geënt en op vloeibaar medium 30 ml. Bacteriële groei werd gescoord na 3 d in het donker bij 37 °C.



### ***Bepaling van de transpiratie van schubben***

Schubben werden rechtovereind in plastic bakjes (3.5 cm) met 10 ml 0.7% agar geplaatst (dus met het snijvlak op het medium). Een laag van 1,5 mm paraffineolie werd er zorgvuldig op gepipetteerd om directe verdamping van het medium te voorkomen. De container + middelgrote schaal + paraffine werd elke 60 min gewogen en het verlies aan het gewicht werd als transpiratie door de schub beschouwd. Er was een te verwaarlozen gewichtsverlies als geen schubben aanwezig waren (minder dan 0,1 µl per uur).

### **Hoofdstuk 5**

De efficiëntie van fotosynthese II werd gemeten volgens Harbinson et al. (2005).

### ***Statistiek***

In de grafieken staan gemiddeldes  $\pm$  SE. De statistische significanties van verschillen in procenten en gemiddeldes werden getest met de  $\chi^2$  en de Student *t*-test, respectievelijk.

### **H3. TWEE NOG NIET EERDER GERAPPORTEERDE BRONNEN VAN BESMETTING**

#### **SAMENVATTING**

Bij initiatie volgens de standaardprocedure bleek er aanzienlijke besmetting te worden geïntroduceerd door twee besmettingsbronnen die tot op heden vrijwel onopgemerkt zijn gebleven. (1) Wanneer schubben werden afgebroken van de moederbol, drongen micro-organismen via de wond naar binnen. Deze besmetting werd versterkt door de negatieve hydrostatische druk in de schubben waardoor niet-steriele vloeistof werd opgezogen. (2) Tijdens het spoelen van schubben met steriel water na de oppervlak-sterilisatie met 1% chloor, raakte het spoelwater verontreinigd met micro-organismen die niet waren afgedood. Dit veroorzaakte de kruisbesmetting. Onder onze omstandigheden leidden deze twee besmettingsbronnen tot ca. 20% en 25% extra besmetting. Beide manieren van besmetting werden afdoende voorkomen met een verdunde oplossing van NaClO (0,03%).

#### **INLEIDING**

De meeste besmettingen in weefselkweek zijn bacterieel (Leifert and Cassells 2001). Micro-organismen kunnen bij ex-vitro planten op het oppervlak van het weefsel voorkomen (epifytische) of binnen in het weefsel (endofytische). Bij initiatie in vitro worden de epifytische meestal efficiënt verwijderd door oppervlak-sterilisatie met 1% chloor, maar voor de endofytische is er geen behandeling. Het belangrijkste obstakel is dat antibiotica, fungiciden en ontsmettingsmiddelen die toegevoegd zijn aan het medium, in het weefsel niet een voldoende hoge concentratie bereiken om effectief af te doden. Dit komt door algemene moeilijkheden bij de opname en het transport bij planten in weefselkweek (De Klerk 2010; De Klerk en Askari 2012). De enige manier om endofytische besmetting af te doden is een warm water behandeling (Langens-

Gerrits, et al. 1998) maar die is vaak niet bruikbaar omdat het weefsel te kwetsbaar is.

Desondanks voegen veel onderzoekers en bedrijven antibiotica aan de voedingsbodem toe. Wanneer de antibiotica na een aantal subculturen worden weggelaten, komen de besmettingen echter altijd terug en gaan in het medium woekeren. Toevoeging van deze antibiotica is echter toch nuttig omdat ze overwoekering van de explantaten voorkomen. Endofytische micro-organismen kunnen tot op zekere hoogte gunstig zijn, maar ze kunnen ook remmen en tot verminderde groei leiden. Een van de doelen van dit onderzoek was dan ook om de groei te verbeteren door endogene besmetting te bestrijden.

Dit hoofdstuk gaat over extra besmetting die geïntroduceerd wordt tijdens de initiatie in weefselkweek. Al redenerend hebben we twee mogelijke manieren van infectie tijdens de initiatie-procedure geïdentificeerd die nog niet of nauwelijks zijn opgemerkt.

(1) Wanneer een explantaat uit de moederplant wordt gesneden, wordt open vaatbundelweefsel blootgesteld aan een niet-steriele omgeving. Aangezien het xyleem een negatieve hydrostatische druk heeft (Taiz and Zeiger 2002), worden na snijden naburige vloeistoffen met micro-organismen opgezogen.

(2) Aangezien het niet haalbaar is om explantaten individueel te steriliseren, worden ze samen in batches van 5 tot 50 of meer verwerkt. Kruisbesmetting kan optreden tijdens het spoelen van explantaten met steriel water om chloor te verwijderen. Meestal worden de explantaten driemaal gespoeld met steriel water (zie, bijv. Pierik 1997, p. 89 en George 1993, Fig. 56). Onderzoekers negeren deze mogelijkheid van kruisbesmetting gewoonlijk omdat er geen haalbare alternatieve procedure lijkt te zijn en omdat men gelooft dat de periode waarin kruisbesmetting kan optreden te kort is om ernstige problemen te veroorzaken.

We gebruikten water met een lage concentratie van NaClO ter bestrijding van deze beide besmettingen. Weefselkwekers gaan er blijkbaar van uit dat ook lage concentraties chloor giftig zijn voor de plant en spoelen chloor waarschijnlijk daarom zo 'fanatiek' weg. Het is echter de vraag of chloor zo giftig is. Sommige onderzoekers voegen zelfs lage niveaus van NaClO toe om groei van micro-

Tabel 3.1. Minimale concentratie van NaClO voor sterilisatie van vloeistoffen.

		NaClO concentratie (%)					
LB Vloeistof		0	0,01	0,03	0,06	0,1	1,5
		+++	++	-	-	-	-
		+++	++	-	-	-	-
		+++	++	-	-	-	-

Aan sterk verontreinigde spoelwater bereid met besmette lilieschubben werd NaClO toegevoegd om de aangegeven concentraties te verkrijgen. Na 2d bij 25 °C, werd 2 ml vloeibaar LB toegevoegd aan 2 ml van de oplossing. Na nog eens 3d bij 37 °C, werd bacteriële besmetting gescoord. (- niet besmet, ++ middellange besmet, +++ zeer besmet).

organismen tijdens weefselweek te voorkomen (Teixeira, et al. 2006). Verder is chloor relatief instabiel en dragen stoffen die door de planten worden uitgescheiden bij tot snelle afbraak.

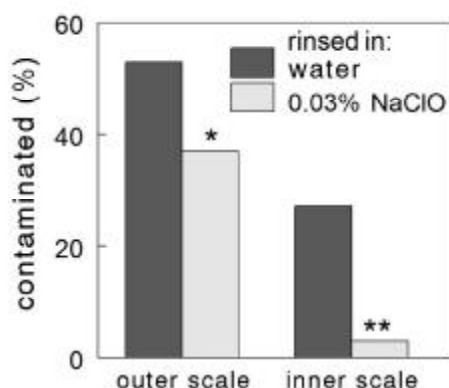
## RESULTATEN

### *Bepaling van de effectieve concentratie van NaClO*

Bacteriën groeiden op 0% en 0,01% NaClO (tabel 3.1). De laagste concentratie van NaClO die volledig remming van bacteriële groei gaf was 0,03%. We gebruikten deze concentratie in de volgende experimenten.

### *Schubben spoelen met 0,03% NaClO in plaats van met water*

Na standaard oppervlak-sterilisatie met 1% NaClO werden schubben gespoeld met water of verdunde NaClO (0,03%). In het spoelwater en in de schubben werd de aanwezigheid van besmetting onderzocht. Uit tabel 3.2 blijkt dat er geen besmettingen in spoelwater met NaClO waren, maar wel in het spoelwater zonder chloor vanaf de 2<sup>e</sup> spoelbeurt en vooral daarna.



**Figuur 3.1.** Besmetting vn explantaten die na oppervlak-sterilisatie gewassen waren met 3 maal steriel water of 3 maal 0.03% NaClO. Na wassen werden ze tot gebruik (1 -3 uur) bewaard in steriel water en 0.03% NaClO respectievelijk. \* =  $P < 0.05$  or \*\* =  $P < 0.01$ .

Na het spoelen, werden explantaten (7 x 7 mm, twee per schub) gesneden en gekweekt op standaard medium. Besmetting werd gescoord gedurende 6 weken. Besmetting na oppervlak-sterilisatie kan worden toegeschreven aan onvolledige oppervlak-sterilisatie, endogene contaminatie of kruisbesmetting tijdens het spoelen. We gingen er van uit dat de meeste kruisbesmetting plaatsvindt vanuit de buitenste schubben (zeer endogeen besmet) naar binnenste schubben (nauwelijks endogeen verontreinigd). Uiteraard is er ook kruisbesmetting van besmette naar niet-besmette buitenste schubben. Bij binnenste schubben daalde het percentage besmetting van 27 na spoelen met

**Tabel 3.2.** Besmetting van spoelvloeistoffen zoals gedetecteerd met LB vast (SM) en vloeibaar (LM) medium.

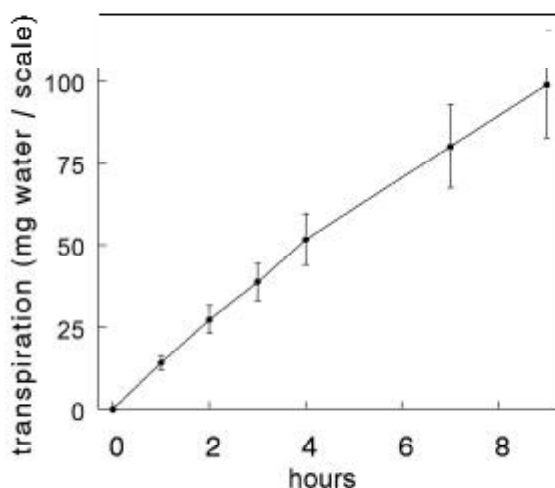
	Water				NaClO			
	1 <sup>e</sup> maal spoelen (1 min)	2 <sup>e</sup> maal spoelen (3 min)	3 <sup>e</sup> maal spoelen (10 min)	Opslag (120 min)	1 <sup>e</sup> maal spoelen (1 min)	2 <sup>e</sup> maal spoelen (3 min)	3 <sup>e</sup> maal spoelen (10 min)	Opslag (120 min)
Test SM	-	-	+	++	-	-	-	-
	-	-	+	++	-	-	-	-
	-	-	+	++	-	-	-	-
Test LM	-	+	++	+++	-	-	-	-
	-	+	++	+++	-	-	-	-

In spoel- en bewaarvloeistoffen werd de aanwezigheid van micro-organismen onderzocht met LB vast en LB vloeibaar. De tests werden 3 en 2 keer uitgevoerd. Bacteriële besmetting werd gescoord na 3 d bij 37 °C. (- niet besmet, ++ middellange besmet, +++ sterk verontreinigd)

water tot 3 na spoelen met NaClO (Fig. 3.1;  $P < 0,05$ ). Ongeveer 25% van de eerder niet-geïnfekteerde binnenste schubben werden kruis-besmet (zie formule in materialen en methoden). Spoelen van de buitenste schubben met 0,03% NaClO verlaagde de besmetting van 53% tot 37% (Fig. 3.1;  $P < 0,01$ ). Een vergelijkbare berekening zoals gedaan voor binnenste schubben liet zien dat in dit geval kruisbesmetting ook ongeveer 25% van de anders niet-besmette buitenste schubben was.

Binneste schubben hadden een veel lagere besmetting dan buitenste. Besmetting van de buitenste schubben was hoog vanwege beschadiging gekoppeld aan hun leeftijd.

Het is mogelijk dat het spoelen in verdunde chloor een negatief effect heeft op de groei in weefselkweek. Dit was niet het geval. Na 11 weken van cultuur, bleken water gespoelde en verdunde-choor gespoelde het even goed te doen.



**Figure 3.2.** Verdamping door lelie schubben bij 21 °C en normale laboratorium luchtvochtigheid (48%).

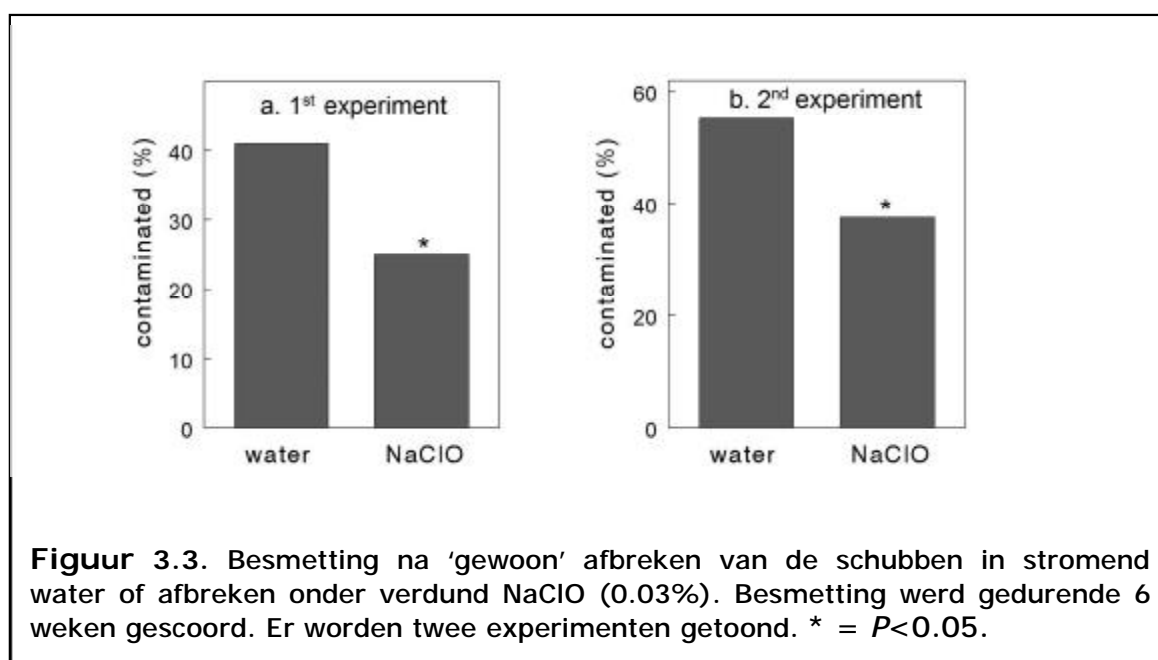
### *Effect van het afbreken van schubben ondergedompeld in 0,03% NaClO i.p.v. water of lucht*

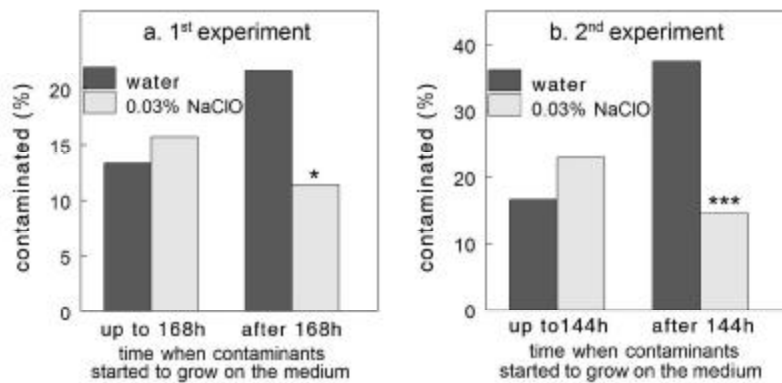
Het xyleem in scheuten staat onder negatieve hydrostatische druk veroorzaakt door transpiratie van water via de huidmondjes. De mate van

transpiratie door bollen is voor zo ver wij weten niet onderzocht. Figuur 3.2 laat zien dat per schub er een transpiratie is van 20  $\mu\text{l}$  per uur of 5 is  $\mu\text{l}.\text{cm}^{-2}.\text{uur}^{-1}$ . In cactussen, is de transpiratie 5-15  $\mu\text{l}.\text{cm}^{-2}.\text{uur}^{-1}$  (Larcher 1995). De negatieve hydrostatische druk blijkt ook uit de opname van water wanneer schubben worden ondergedompeld in water. Die is 40  $\mu\text{l}$  per schub tijdens het eerste uur en daalt naar 10  $\mu\text{l}.\text{uur}^{-1}$  na 8 h.

Om te voorkomen dat niet-steriel water werd opgezogen, werden de schubben ondergedompeld in 0.03% NaClO afgebroken of als controle onder water. De oppervlak-sterilisatie (30 min in 1% NaClO) werd 60 min later uitgevoerd. Om overtollig NaClO te verwijderen werden de schubben daarna gespoeld in 0,03% NaClO. Explantaten (7 x 7 mm, twee per schub) werden gesneden en gekweekt op standaard medium. Besmetting werd gedurende 6 weken gescoord. Afbreken onder verdund NaClO in plaats van water verminderde verontreiniging in twee opeenvolgende experimenten van 41% tot 25% en 55 tot 37% respectievelijk (Fig. 3.3.; beiden  $P < 0.05$ ). Besmetting door opzuigen van niet-steriel water vond plaats in ongeveer 20% van de aanvankelijk niet-geïnfecteerde binnenste schubben (berekend met de formules in materialen en methoden).

Het viel op dat bij de schubben die onder water waren afgebroken, besmetting gedurende een veel langere periode voor het eerst zichtbaar werd.

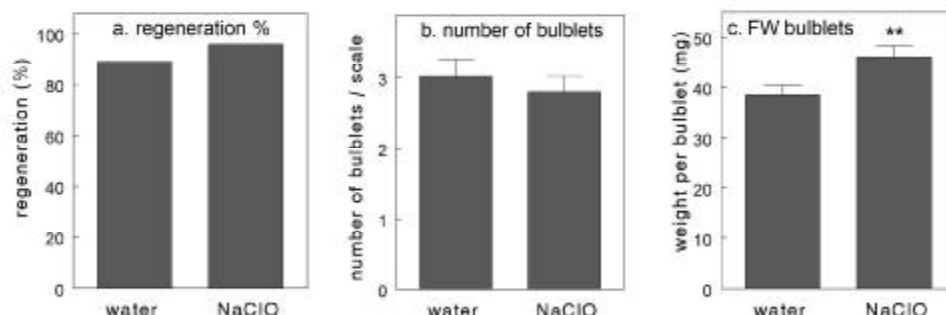




**Figure.3.4.** Hetzelfde experiment als in 3.3. maar hier wordt onderscheid gemaakt tussen de besmetting die de eerste week en de besmetting die daarna zichtbaar wordt. \* =  $P < 0.05$  and \*\*\* =  $P < 0.001$ .

Daarom scoorden we besmetting die gedurende de eerste week zichtbaar werd en besmetting die daarna zichtbaar werd. De besmetting die zichtbaar werd tijdens de eerste 7 dagen was bij beide groepen schubben hetzelfde maar daarna was de besmetting van schubben die in water waren afgebroken veel hoger (Fig. 3.4;  $P < 0.05$  in het 1<sup>e</sup> experiment en  $P < 0,001$  in het 2<sup>e</sup> experiment). De snelheid waarmee besmetting zichtbaar wordt, weerspiegelt de tijd die de micro-organismen nodig hebben om uit het explantaat te komen. De besmettingen die na een week zichtbaar werden bevonden zich dus meer naar de binnenkant van de explantaten.

Het gebruik van de verdunde chloor bij het afbreken van de schubben had mogelijk een negatief effect op de weefselweek. Dit bleek echter niet het geval (Fig. 3.5). De groei was juist enigszins (20%) meer na de extra NaClO behandeling ( $P < 0,01$ ).

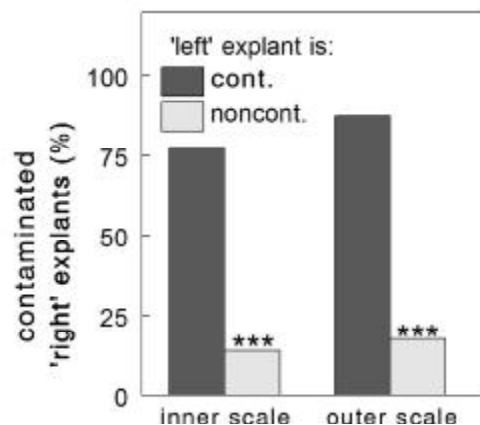


**Figuur 3.5.** Regeneratie van bolletjes uit schubexplantaten gesneden van schubben die ofwel onder water ofwel onder verdund NaClO van de moederbol waren gebroken. De verschillende parameters werden na 11 weken weefselweek gescoord. \*\* =  $P < 0.01$ .



### *Correlatie tussen de besmetting van explantaten die uit één schub zijn gesneden*

We wilden weten of explantaten afkomstig van dezelfde schub een vergelijkbare mate van besmetting hadden. We sneden daarom van iedere schub twee explantaten, een van de linker- en een van de rechterkant van de schub. Wanneer bij de binnenste schubben het linker explantaat besmet was, waren 77% van de overeenkomstige rechter explantaten (= explantaten gesneden van dezelfde schub maar aan de rechterkant) besmet (Fig. 3.6). Wanneer het linker explantaat niet besmet was, was van de corresponderende rechter explantaten slechts 14% besmet. Het verschil is statistisch significant ( $P < 0.001$ ). Voor de buitenste schubben, waren deze percentages 88% en 15% respectievelijk en ook significant ( $P < 0.001$ ).



**Figure 3.6.** Correlatie van de besmetting tussen explantaten gesneden van dezelfde schub. Er werden van schubben twee explantaten gesneden, een van de rechter en een van de linker kant. Het diagram laat het besmettingspercentage van het rechter explantaat zien afhankelijk van de besmetting van het linker explantaat. \*\*\*betekent  $P < 0.001$ .

## DISCUSSIE

In weefselkweek is besmetting is een permanent probleem. De endogene besmetting die bij het verzamelen van het plantmateriaal in het weefsel aanwezig is, kan (nog) niet bestreden worden. De epifytische besmetting (die op het oppervlak leeft) is in principe geen probleem. Daarnaast is er de besmetting die zijn oorsprong heeft in het weefselkwekende personeel. Naast de 'normale' fouten bij in- en overzetten en kapotte apparatuur, heeft dit hoofdstuk twee nog niet eerder beschreven systematische fouten bij inzetten aangetoond. In weefselkweek van lelie, kan aanzienlijke besmetting veroorzaakt worden tijdens de initiatie, zowel door het binnendringen van micro-organismen in het weefsel direct na het afbreken van de schubben (ca. 20% extra verontreiniging in onze omstandigheden) en tijdens het spoelen met 'steriel' water na oppervlak-sterilisatie (ca. 25% extra verontreiniging in onze omstandigheden). Beide zijn doeltreffend te voorkomen met een verdunde oplossing van NaClO (0,03%). Deze doeltreffende maatregelen zijn waarschijnlijk ook geschikt voor andere soorten.

In de experimenten gebruikten we een lage concentratie (0,03%, 300 mg/liter) NaClO voor extra desinfectie. Deze concentratie was effectief (tabel 1) en wordt eveneens gebruikt in de medische praktijk (bij kanaalbehandelingen, Heling 2001). In zwembaden gaat men uit van een gehalte van 0.3 tot 1,5 mg/liter ([http://www.brulabo.irisnet.be/milieudienst?lang=nl#Vrij\\_chloor](http://www.brulabo.irisnet.be/milieudienst?lang=nl#Vrij_chloor)). Opgemerkt moet worden dat de bacteriën die afgedood moeten worden vrij in de vloeistof bewegen en daarom kwetsbaar zijn. Bij gevolg kunnen we een veel lagere concentratie van NaClO gebruiken dan bij oppervlak-sterilisatie.

De groei na de verdunde chloor behandeling was ong. 20% beter, waarschijnlijk door de afwezigheid van micro-organismen. Er zijn nu experimenten ingang gezet om te onderzoeken of de endogene besmetting die aanwezig is voor het afbreken van de schubben ook verwijderd kan worden.

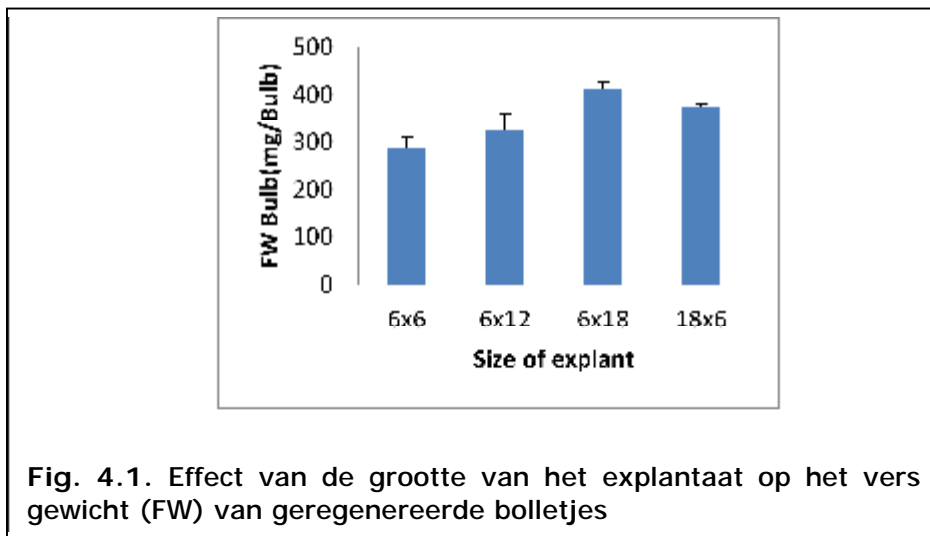
## **H4. HET EFFECT VAN HET SCHUBEXPLANTAAT OP DE GROEI VAN BOLLETJES**

### **INLEIDING**

In twee populariserende artikelen is door ons de vraag aan de orde gesteld hoe planten (met name scheutculturen maar ook leliebolletjes die op schubexplantaten regenereren) het klaarspelen om in weefselkweek te groeien (De Klerk 2010; De Klerk and Askari 2012). Het kernprobleem waarvan je zou verwachten dat het groei vrijwel onmogelijk maakt, is het vervoer van mediumcomponenten in de plantjes: hoe komen mediumcomponenten in het plantje op hun plaats van bestemming, wat suiker betreft in de groeiende, jonge weefsels. Bij discussies over dit onderwerp met collega's blijkt dat zij zich dit probleem niet gerealiseerd hebben en dat ze denken dat diffusie voldoende is om de mediumingrediënten naar de groeiende weefsels in de plantjes te brengen. Omdat diffusie echter geen verplaatsing in één richting is, is het een zeer inefficiënte verplaatsingsmethode.

Hoe gebeurt het dan wel? In het geval van lelie denken we dat bijv. suiker in het schubexplantaat in het floëem wordt geladen en van daar uit op de normale manier (zoals ook gebeurt bij schubben in vochtige vermiculiet) naar het groeiende bolletje wordt getransporteerd. Mogelijk speelt vervoer in het xyleem ook een rol. In eerder onderzoek (Langens 2003) is gevonden dat er bij een klein explantaat maar weinig bolgroei is. De reden hiervan was toen nog geheel onduidelijk. Wel werd aangetoond dat het niet zo was dat kleine explantaten kleine groeipunten vormden die daarna alleen maar kleine bolletjes konden maken. De grootte van het explantaat had op de een of andere manier een direct effect op de groei van de bolletjes. Nu denken we dus dat dit te maken heeft met de capaciteit van het explantaat om suiker in het floëem te kunnen laden. Een groot explantaat kan dit beter omdat er meer suiker uit het medium wordt opgenomen (Langens 2003) en/of omdat het meer floëem bevat.

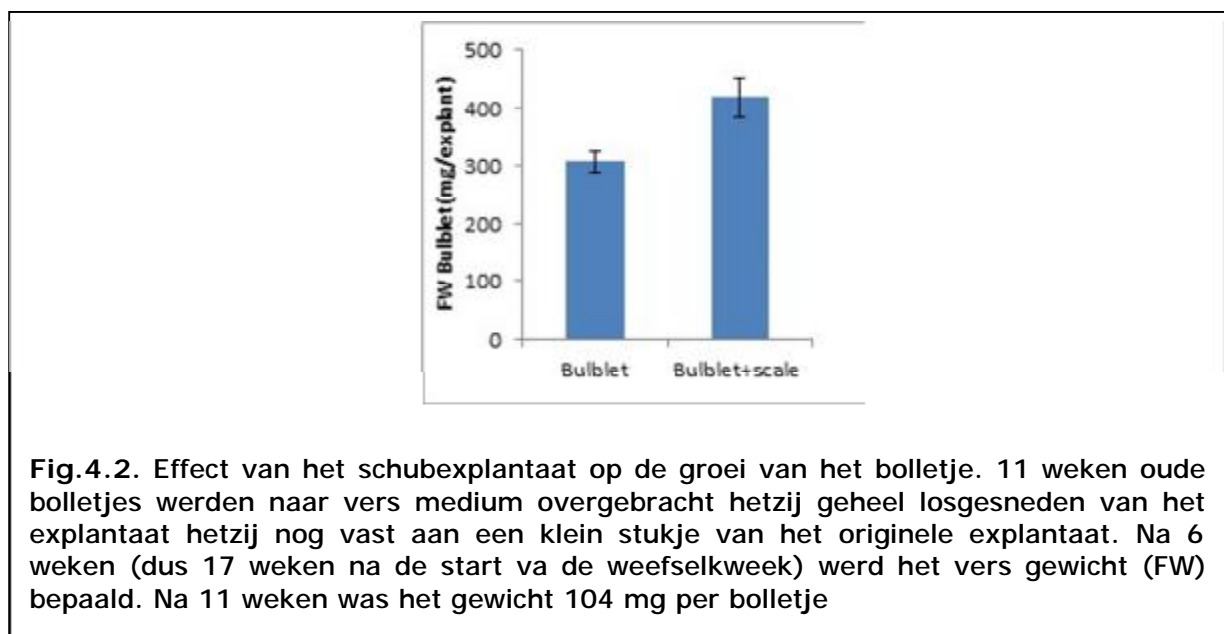
In dit hoofdstuk worden enkele schubfactoren getest wat betreft hun effect op de bolgroei.



## RESULTATEN:

### *De grootte van explantaat*

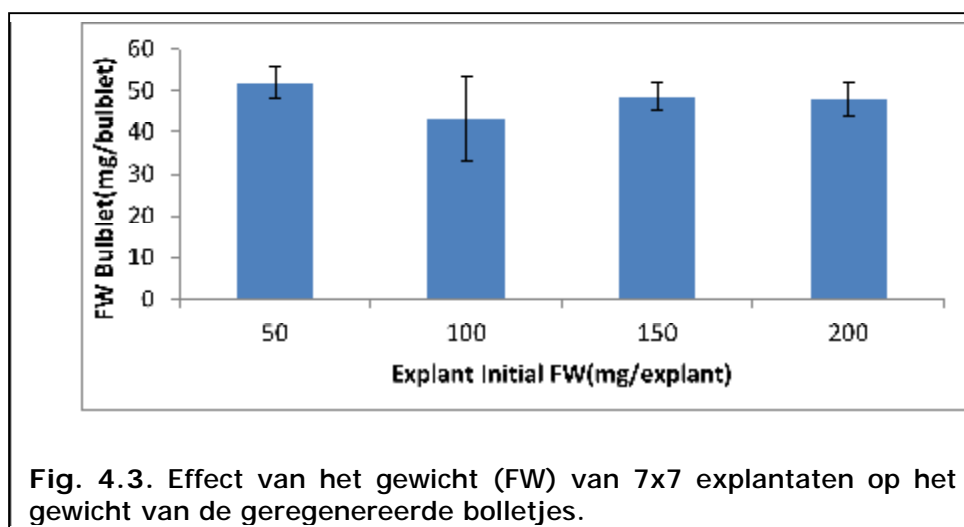
Het vers gewicht van bolletjes nam toe met de schubgrootte explant (Fig. 4.1). De zwaarste bolletjes werden gevormd op een 6x18 mm explantaat en de kleinste bolletjes op een 6x6 mm explantaat. De effecten waren evenwel minder



groot dan voorheen gevonden (Langens 2003).

Om het effect van het explantaat in meer detail te bestuderen, werden bolletjes 11 weken na de start van weefselkweek naar vers medium overgebracht. Ze werden ofwel van het explantaat losgesneden of overgezet met nog een klein stukje van het oorspronkelijke explantaat. Na 6 weken werd het vers gewicht bepaald. Figuur 3.2 laat zien dat bolletjes die aan het kleine stukje explantaat vast zaten veel meer groeiden. Het vers gewicht na 11 weken was 104 mg. De bolletjes met een stukje explantaat waren met 300 mg toegenomen en de afgesneden bolletjes met 200 mg.

Grote explantaten hebben een groter oppervlak (dus meer contact met het medium en daardoor meer mogelijkheid tot opnemen) en een grotere inhoud (dus hebben zelf meer reserve materiaal dat gebruikt kan worden voor de groei van de bolletjes en waarschijnlijk ook meer floëem zodat er meer kan worden geladen). Schubben verschillen aanzienlijk in dikte en explantaten van 7x7 mm kunnen daardoor grote verschillen in inhoud hebben. Het aantal bolletjes dat per explantaat gevormd werd was hetzelfde bij zware en bij lichte 7x7 explantaten dus de gegevens worden niet beïnvloed door verschillen in concurrentie om de voedingsstoffen. Fig. 4.3 laat zien dat de inhoud van het explantaat zelf (=vers gewicht van de explantaten) geen effect heeft op het gewicht van de geregenereerde bolletjes.



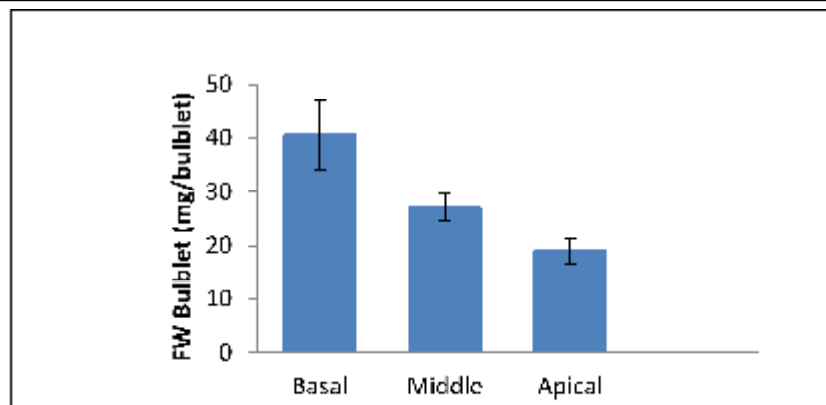


Fig.4.4. Effect van de originele positie van het explantaat op de schub op de groei van regenererende bolltjes.

*Het effect van de positie op de schub waar het explantaat gesneden is.*

De originele positie van het explantaat in de schub had een grote invloed op de bolgroei. Explantaten uit de basale kant (=onderkant) produceerden de zwaarste bolletjes (Fig. 4.4). Explantaten die van de binnenkant van de schub gesneden waren produceerden grotere bolletjes dan explantaten van de buitenkant (Fig. 4.5)

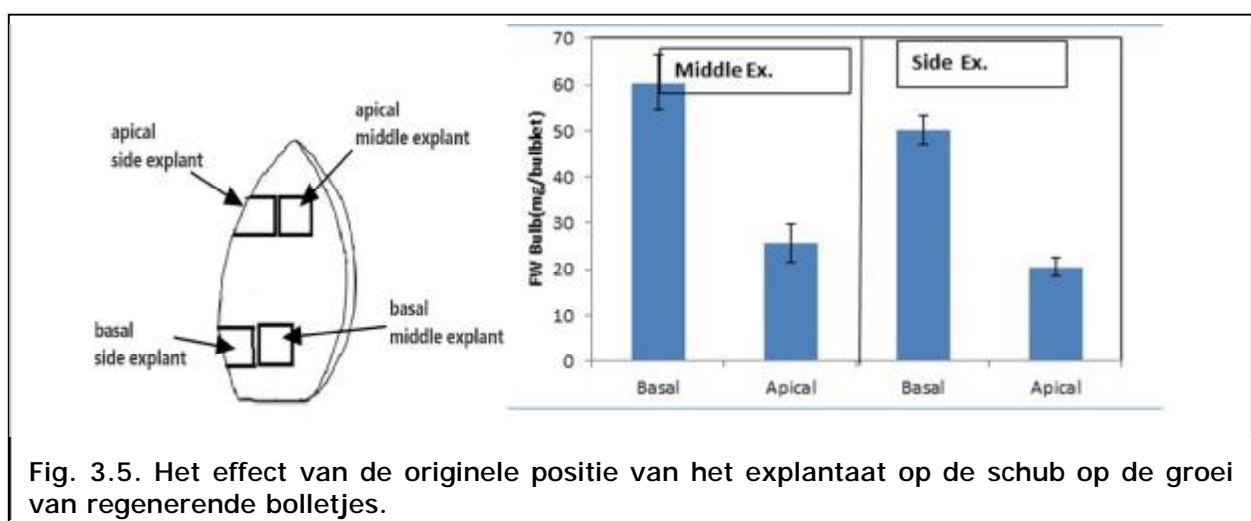


Fig. 3.5. Het effect van de originele positie van het explantaat op de schub op de groei van regenererende bolletjes.

## DISCUSSIE

De grootte van het explantaat is van groot belang voor de groei van bolletjes. De term 'grootte' moet evenwel gepreciseerd worden. Fig. 3.2 laat zien dat het gewicht van geen belang is. Daarom lijkt in eerste instantie het oppervlak van belang. (1) Dit kan het oppervlak voor opname uit het medium zijn. Dan zou de opname door de epidermis van belang zijn en niet zo zeer de opname door het wondvlak. De opname door de epidermis wordt voor een groot deel geblokkeerd door een waslaag. Eerste resultaten hebben laten zien dat het verwijderen van de waslaag (chemisch met een oplosmiddel, afsnijden geeft een wondeffect) grotere bolletjes geeft. (2) Het kan evenwel ook het oppervlak van een laag in het explantaat zijn. Wat dit laatste betreft, bolletjes worden aan de bovenkant (de adaxiale zijde) gevormd. Mogelijk zijn alleen de vaatbundels die in de laag op dezelfde hoogte liggen van belang.

Naast de grootte van het explantaat is de originele positie in de schub van groot belang voor de groei van de bolletjes. Basale explantaten doen het het best. Wat is het verschil tussen de basale en de apicale explantaten? Hebben ze andere groeihormonen? Verschillende hoeveelheden floëem? Verschillende hoeveelheden epidermaal was?

## **H5. DE ROL VAN FOTOSYNTHESE BIJ DE BOLGROEI**

### **INLEIDING**

Ex vitro groeiende planten voorzien in hun behoefte aan sucrose door de fotosynthese. In weefselkweek wordt suiker via het medium toegediend en is/likt fotosynthese voor de suikervoorziening overbodig. Toch gebeurt weefselkweek meestal in het licht omdat licht ook een rol heeft bij het sturen van ontwikkelingsprocessen. Als de plantjes in het donker staan gaan ze meestal etioleren: ze worden heel lang, blijven dun en zijn wit. Doordat ze zo lang worden vallen ze om en hebben ze veel problemen met het interne transport (omdat er veel grotere afstanden overbrugd moeten worden).

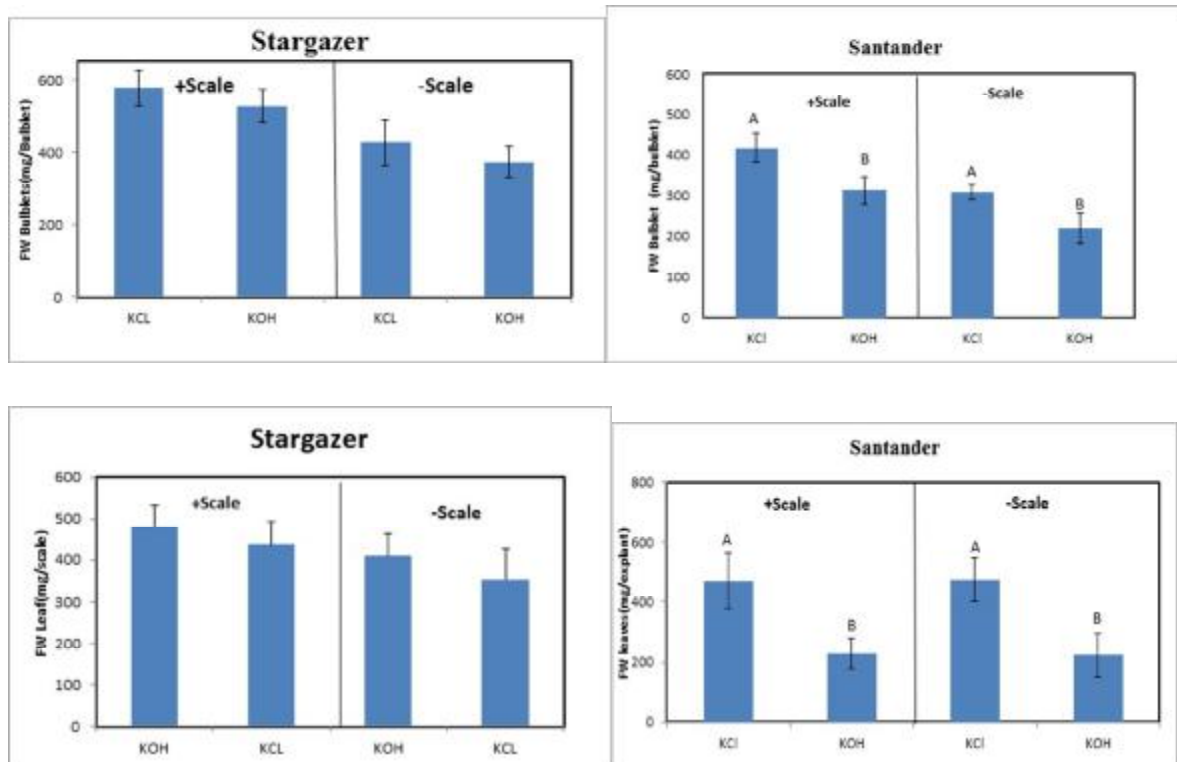
Aanvankelijk dacht men dat er nauwelijks fotosynthese in weefselkweek kan zijn, omdat er een overmaat vrij sucrose is en sucrose de fotosynthese remt. Er bleek echter voldoende fotosynthese om de CO<sub>2</sub> concentratie tijdens de lichtperiode tot dicht in de buurt van 0 te laten dalen.

Maar speelt de fotosynthese een rol bij de groei? De beste manier om dat te onderzoeken is door de fotosynthese te remmen. In het donker kweken is geen optie vanwege het effect op de morfologie (zie boven). Er zijn twee andere mogelijkheden: fotosynthese remmers en verwijdering van CO<sub>2</sub> uit de gasfase door een KOH oplossing. Het is opmerkelijk dat hieraan bij ons weten nooit experimenten bij scheuten in weefselkweek over zijn gepubliceerd. Fotosynthese remmers lijken minder geschikt vanwege bijwerkingen in het bijzonder omdat de behandelperiodes erg lang zijn (6 weken of langer). Aan het gebruik van KOH zijn kleinere problemen verbonden. Het vangt CO<sub>2</sub> efficiënt weg uit de gasfase, maar CO<sub>2</sub> dat door de plantjes wordt gemaakt wordt mogelijk meteen gebruikt voor de fotosynthese zonder dat het het plantje verlaat. De fotosynthese is dus waarschijnlijk niet voor 100% geremd. Een tweede probleem is dat KOH oplossingen hygroscopisch zijn en de relatieve luchtvochtigheid tot 85% verlagen. Om dat laatste probleem op te lossen is bij de controle de relatieve luchtvochtigheid in dezelfde mate verlaagd door een KCl oplossing.



## RESULTATEN

Na 11 weken regeneratie bij standaardcondities werden bolletjes overgezet voor 6 weken naar vers medium. Tijdens deze 6 weken werd CO<sub>2</sub> weggevangen met KOH en in de controle werd de luchtvochtigheid verlaagd tot hetzelfde niveau als in de KOH containers met KCl. De resultaten (Fig. 5.1) laten een verminderde groei zien in aanwezigheid van KOH. Wanneer de 11 weken durende regeneratie werd uitgevoerd met KOH was de groei eveneens minder (Fig. 5.2).



**Fig. 5.1.** Leliebolletjes werden onder standaardcondities geregenereerd en na 11 weken overgezet naar vers medium, hetzij helemaal losgesneden van het explantaat hetzij met nog een klein stukje explantaat er aan vast. Tijdens de 6 weken werd CO<sub>2</sub> weggevangen met een KOH oplossing. In de controle werd de relatieve luchtvochtigheid tot hetzelfde niveau als in de KOH-containers teruggebracht met KCl.

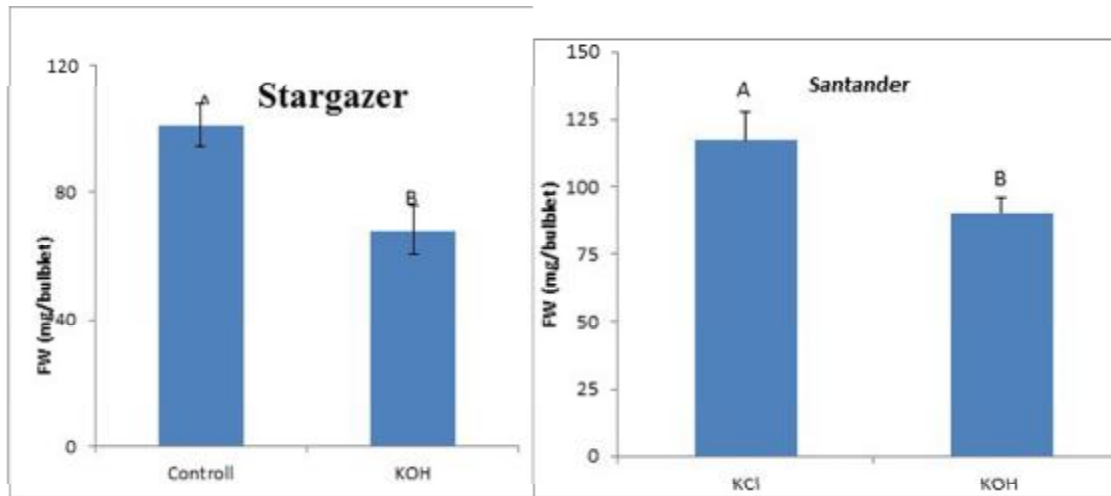


Fig.5.2. Vers gewicht van geregenereerde leliebolletjes na 11 weken cultuur met en zonder CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> werd weggevangen met een KOH oplossing en in de controle werd de luchtvochtigheid tot eenzelfde niveau als bij KOH teruggebracht door een KCL oplossing.

Om meer duidelijkheid te krijgen over de rol van fotosynthese en over het effect van KOH hebben we de efficiëntie van fotosynthese II gemeten (Fig. 5.3). Zoals verwacht lag die lager bij weefselkweekplantjes en veel lager bij weefselkweekplantjes gegroeid in de afwezigheid van CO<sub>2</sub>. Om een indruk te krijgen van de algemene geldigheid hebben we dit zowel bij lelie als bij arabidopsis gemeten.

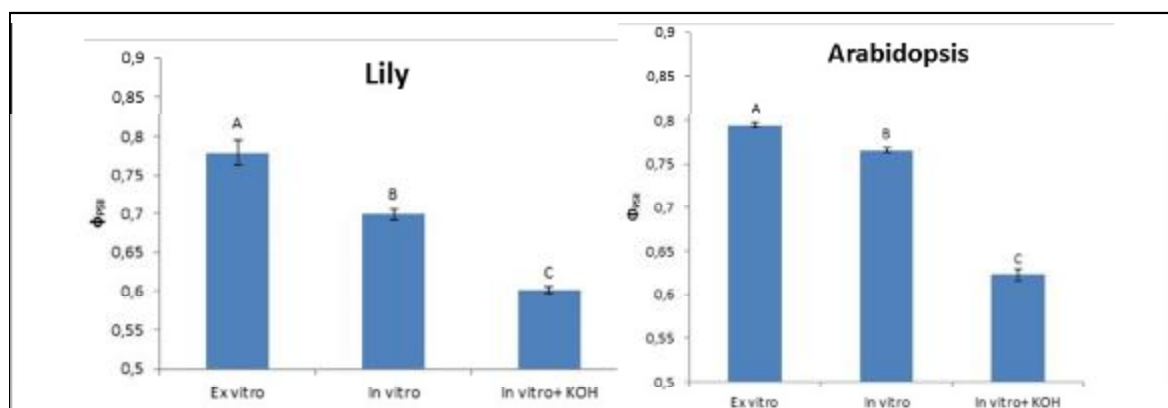


Fig. 5.3. De efficiëntie van fotosynthese II bij ex-vitro planten en in vitro planten met en zonder CO<sub>2</sub> (de laatste aangegeven als met KOH). De proef is zowel met lelie als met arabidopsis gedaan.

## DISCUSSIE

Het lijkt duidelijk dat fotosynthese een belangrijke bijdrage levert aan de groei van leliebolletjes. Hier moeten enkele kanttekeningen worden gemaakt.

Leliebolletjes groeien ook goed in het donker. Een vergelijking met de huidige experimenten is echter niet aan de orde omdat bij de kweek in het donker de morfologie van de regenererende plantjes ook heel anders is. In het donker ontstaan er nauwelijks blaadjes. Commercieel wordt lelie vaak bij spreadlicht vermeerderd.

Bij onze experimenten gaan we er van uit dat KOH alleen een effect heeft op de hoeveelheid CO<sub>2</sub>. Deze aanname is naar alle waarschijnlijkheid correct maar CO<sub>2</sub> heeft behalve een rol als grondstof voor de fotosynthese ook andere effecten op de plant. Bekend is het effect op de huidmondjes. Die sluiten bij hoge CO<sub>2</sub>. Hoe de openingstoestand is bij zeer lage CO<sub>2</sub> hebben we niet in de literatuur weten te achterhalen.

## **H6. DE INVLOED VAN MILDE STRESS OP BOLGROEI**

### **INLEIDING**

Een van de favoriete thema's van de huidige plantenbiologie is dat dat planten een groot aantal verdedigingstechnieken tegen biotische en abiotische stress hebben ontwikkeld, veel meer dan dieren. Dit is het gevolg van het feit dat het feit dat planten zich niet kunnen verwijderen van bedreigende situaties en dieren wel. Een voorbeeld van het bestaan van die verdedigingstechnieken (met allerlei toepassingsmogelijkheden voor de praktijk) is het volgende experiment. Als je arabidopsis kiemplantjes een milde stress geeft, gaan ze zich op biochemisch niveau wapenen. Het betreft onder andere de aanmaak van stoffen met een laag molecuulgewicht (bijv. het aminozuur proline) en stoffen met een hoog molecuulgewicht (chaperone-eiwitten) die allebei kwetsbare macromoleculen (bijv. macromoleculen in membranen) beschermen. Door de aanwezigheid van deze beschermende stoffen zijn planten die behandeld zijn met een milde stress in staat zware stress te overleven terwijl de controle groep die geen milde stress heeft gekregen dood gaat (De Klerk and Pumisetapong 2008).

Bij alstoemeria geeft milde stress veel betere rizoomgroei (Pumisetapong et al. 2012). Deze respons ligt in dezelfde richting als die in de vorige alinea wordt beschreven: rizomen zijn ondergrondse opslagorganen die o.a. ten doel hebben de plant bij stressvolle omstandigheden te laten overleven en zijn dus een beschermingsmechanisme voor de individuele plant. Wij onderzochten of deze respons ook in weefselkweek van lelie gebeurde.

## RESULTATEN EN DISCUSSIE

Twaalf weken oude Santander bolletjes kregen een hete lucht behandeling (HAT) voor 0, 1, 2, 3, 4 en 5 uur bij 44 °C). Na 6 weken werd het vers gewicht van de bolletjes gemeten. De meeste groei was bij 1 en 2 uur HAT (Fig. 6.1). Bij Stargazer werden de hete lucht (HAT) en heet water (HWT) behandeling vergeleken. Beiden hadden een gelijksoortig effect. Het meeste effect werd gevonden als de bolletjes nog vastzaten aan een klein stukje van de originele schub (Fig. 6.2)

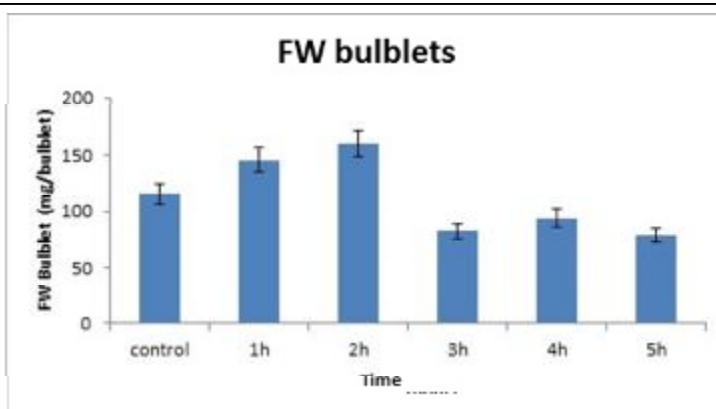


Fig. 6.1. Effect van de duur van de hete lucht behandeling (44 °C) op bolgroei van Stargazer

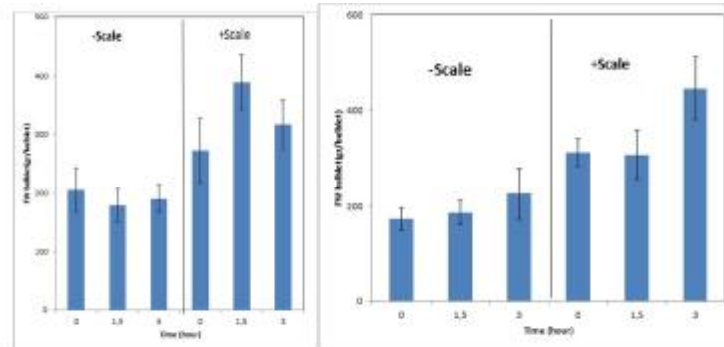


Fig. 6.2. Effect van een hete lucht (HAT, links) en een heet water (HWT, rechts) behandeling op de groei van bolletjes.

Wij interpretern de resultaten als een beschermend actie van het plantje. Hij komt onder stress te staan en gaat dan vooral ondergronds groeien en maakt dus zwaardere bollen. Als de stress voorbij is kan hij beter groeien door de extra reserves. Dit is respons die zijn vruchten voor het plantje op een lange-termijn afwerpt. Maar is er ook een respons voor de korte termijn. Daarvoor gaven we een milde stress gevolgd door een zware stress die anders dodelijk is. Fig. 6.3 laat zien dat er ook een korte termijn respons is. Met milde stress voorbehandelde bolletjes doen het duidelijk beter bij de zware stress.

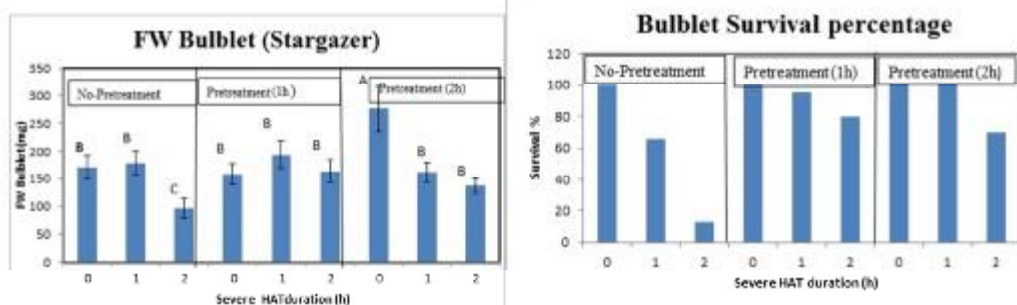


Fig. 6.2. Beschermend effect van milde stress tijdens een daaropvolgende zware stress.

## REFERENTIES

- Aguettaz P, Paffen A, Delvallée I, Van der Linde P, De Klerk GJ (1990) The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated in vitro - 1. The effects of culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22:167-172
- De Klerk GJ (2010) Why plants grow in tissue culture. . *Prophyta Annual* 2010 42-44
- De Klerk GJ, Askari N (2012) A Century of Plant Tissue Culture. Basal features ignored for too long. *Prophyta Annual* 2012 46-49
- De Klerk GJ, Pumisitapon P (2008) Protection of in-vitro grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:149-154
- George EF (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Exegetics*, Edington
- Harbinson J, Van Meeteren U, Van Rensen R (2005) The use of imaging of the efficiency of photosystem II electron transport to visualise the effect of dry storage on the photosynthesis and stomatal closure of cut rose stems. In, pp 57-62
- Langens-Gerrits M, Albers M, De Klerk GJ (1998) Hot-water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52:75-77
- Langens MM (2003) Phase change, bulb growth and dormancy development in lily. Proefschrift RUN
- Leifert C, Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37:133-138
- Pierik RLM (1997). *In Vitro culture of higher plants*. 4th ed Dordrecht: Kluwer, 348 pp
- Pumisitapon P, Visser RGF, de Klerk GJ (2012) Moderate abiotic stresses increase rhizome growth and outgrowth of axillary buds in *Alstroemeria* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110:395-400
- Robb SM (1954) *Physiological Investigations on Regeneration from Bulb Scale Leaves of Lilium Speciosum* Thun: Thesis Presented for the Degree of Doctor of Philosophy, University of New Zealand. Massey University
- Robb SM (1957) The culture of excised tissue form bulb scales of *Lilium speciosum*Thun. *Journal of Experimental Botany* 8:348-352
- Stimart DP, Ascher PD (1978) Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 103:182-184
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant physiology*. New York: Sinauer
- Teixeira SL, Ribeiro JM, Teixeira MT (2006) Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86:375-378

## **AFGELEVERDE PRODUCTEN**

(publicaties geheel of deels geschreven in het kader van het project)

**G-J De Klerk (2012): Micropropagation of bulbous crops: technology and present state. Floricult. Orn. Biotech. 6: 1-8**

**G-J de Klerk and N. Askari (2012): A Century of plant tissue culture; Basal features ignored for too long. Prophyta Annual 2012: 46 - 49.**

**G-J de Klerk (2013) Micropropagation of lily: history, obstacles and advancements on the horizon. The Lily Yearbook of the North American Lily Society (in press).**

**N. Askari and G-J de Klerk (2013): Avoidance of cross-contamination during the initiation step in lily tissue culture. The Lily Yearbook of the North American Lily Society (in press).**

**N. Askari, Y.G. Wang and G.-J. de Klerk (2014): In lily tissue culture, explants may become heavily contaminated by the standard initiation procedure. Prop. Orn. Plants (in press).**

### **In de planning**

- Proefschrift Naser Askari
- 2 of 3 artikelen in Vakbladen (Bloembollenvisie, ProPhyta)
- 3 of 4 wetenschappelijke artikelen
- 1 lezing Nederl. Ver. Plantenbiotechnologie en –Weefselkweek (NVPW)